

# BETA-N-ACETYLGALACTOSAMINIDASE GENE

Patent Number: JP11089574  
Publication date: 1999-04-06  
Inventor(s): KOBAYASHI RIYOUKO;; TANAKA ATSUSHI;; FUJIYAMA KAZUHITO;; SEKI TATSUJI;; YOSHIDA TOSHIOMI  
Applicant(s): DAIWA KASEI KK  
Requested Patent: ☐ JP11089574  
Application Number: JP19970252441 19970917  
Priority Number (s):  
IPC Classification: C12N15/09; C12N1/21; C12N9/24  
EC Classification:  
Equivalents:

---

## Abstract

---

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject gene for producing &beta;-N-acetylgalactosaminidase having high specificity to N-acetyl-&beta;-galactosaminidase bond, and useful for elucidation of the structure of a sugar chain and biological activities thereof, by a genetic engineering technique.

**SOLUTION:** The subject gene is an isolated DNA including a nucleotide sequence encoding a polypeptide capable of separating N-acetyl-D galactosamine present in the nonreducing terminal of a sugar chain and bound by &beta;-glucoside bond but not separating N acetyl D glucosamine at the nonreducing terminal and bound by the &beta;-glucoside bond, and having &beta;-N-acetylgalactosaminidase activities (or functionally same activities as them). The gene is obtained by culturing Bacillus sp. AT 173-1 (FERM P-15390) strain, isolating the &beta;-N-acetylgalactosaminidase from the culturing liquid, determining the N-terminal amino acid sequence of the separated &beta;-N-acetylgalactosaminidase, synthesizing a primer, etc., for a PCR method, and cloning the subject gene.

---

Data supplied from the esp@cenet database - 12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-89574

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月6日

(51) Int. Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00
1/21		1/21
9/24		9/24
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	
C 1 2 R 1:07)		

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-252441

(22) 出願日 平成9年(1997) 9月17日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年7月25日  
 社団法人日本生化学会発行の「生化学V o 1. 69 N  
 o. 7」に発表

(71) 出願人 390014889

大和化成株式会社

大阪府大阪市天王寺区上本町5丁目7番12号

(72) 発明者 小林 亮子

兵庫県神戸市東灘区住吉南町5-10-36

(72) 発明者 田中 淳

滋賀県甲賀郡甲西町若竹町5番地

(72) 発明者 藤山 和仁

大阪府吹田市山田西1-28 A18-308

(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ遺伝子

(57) 【要約】

【課題】 糖タンパク質および糖脂質などの構造解析などに有用な $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するホリペプチドを工業的に有利に製造する方法を提供すること。

【解決手段】  $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するホリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有する単離されたDNA、このDNAを含む組換えDNAおよび発現ベクター、この発現ベクターにより形質転換した形質転換体ならびにこの形質転換体を用いて前記ホリペプチドを製造する方法が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】  $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離されたDNAであって、該ポリペプチドは、糖鎖の非還元末端にある $\beta$ -グリコシド結合したN-アセチル-D-ガラクトサミンを遊離させるが、非還元末端にある $\beta$ -グリコシド結合したN-アセチル-D-グルコサミンは遊離させない、DNA。

【請求項2】 前記ポリペプチドがバシラス (*Bacillus*) 属に属する細菌に由来する、請求項1記載のDNA。

【請求項3】 前記細菌がバシラスsp. (*Bacillus* sp.) AT173-1 (FERM P-15390)である、請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 前記ポリペプチドが配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、請求項1〜3のいずれかに記載のDNA。

【請求項5】 前記ポリペプチドが、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有する、請求項1に記載のDNA。

【請求項6】 配列表の配列番号2に記載のヌクレオチド配列を含む、請求項1〜4のいずれかに記載のDNA。

【請求項7】 配列表の配列番号2に記載のヌクレオチド配列において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加されたヌクレオチド配列を含み、かつ $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載のDNA。

【請求項8】 配列表の配列番号2に記載のヌクレオチド配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得、かつ $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載のDNA。

【請求項9】 請求項1〜8のいずれかに記載のDNAを含む、組換えDNA。

【請求項10】 宿主細胞において $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドを発現する能力を有する発現ベクターである、請求項9に記載の組換えDNA。

【請求項11】 前記宿主細胞が、微生物細胞、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞である、請求項10に記載の組換えDNA。

【請求項12】 請求項10または11に記載のベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項13】 請求項12に記載の形質転換体を培養する工程、得られる培養物より $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドを採取する工程を包含する、 $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ（以下、 $\beta$ -GalNAcaseと略記する）活性を有するポリペプチドをコードするDNA、およびこのDNAを用いる $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、複合糖質と呼ばれる分子（例えば、糖タンパク質および糖脂質など）の糖鎖部分が有する種々の生理的機能が注目されている。糖鎖の構造およびその生物活性を解明するために、糖質分解酵素は非常に有用な研究手段として利用されている。中でも、エキソグリコシダーゼ（これは、糖鎖の非還元末端に存在するグリコシド結合に作用して非還元末端の糖を糖鎖から切り離す反応を触媒する）は、糖タンパク質の構造または機能の解析に用いられている。

【0003】複合糖質の糖鎖にはN-アセチル- $\beta$ -ガラクトサミニド結合が存在することがある。これを分析するために、従来は、 $\beta$ -N-アセチルヘキササミニダーゼが利用されていた。この酵素は、N-アセチル- $\beta$ -ガラクトサミニド結合のみならず、N-アセチル- $\beta$ -グルコサミニド結合をも分解する。従って、この $\beta$ -N-アセチルヘキササミニダーゼを用いて糖鎖の非還元末端の糖を切断する場合、切断された結合がN-アセチル- $\beta$ -ガラクトサミニド結合またはN-アセチル- $\beta$ -グルコサミニド結合のいずれであるかは不明であった。

【0004】最近、N-アセチル- $\beta$ -ガラクトサミニド結合のみに対して高い特異性を有する $\beta$ -GalNAcaseが、バシラスsp. (*Bacillus* sp.) AT173-1 (FERM P-15390)により産生されることが見いだされた（特願平8-12311、およびJ. Biochem. 122, 330-336 (1997)）。この酵素が有する上記のような特異性から、この酵素により切断され得る糖鎖の非還元末端の糖が有する結合が、N-アセチル- $\beta$ -ガラクトサミニド結合であることが決定され得る。従って、バシラスsp. AT173-1由来の $\beta$ -GalNAcaseは、糖鎖の構造およびその生物活性を解明するために非常に有用な酵素である。

【0005】バシラスsp. AT173-1を培養して $\beta$ -GalNAcase

seを取得する場合、非常に多量の $\beta$ -GalNAcase以外のタンパク質が生産される。それゆえ、これらと $\beta$ -GalNAcaseを分離精製するためには、何回ものカラムクロマトグラフィー操作などの工程が必要とされるので、収率が非常に低かった。 $\beta$ -GalNAcaseを*Bacillus* sp. AT173-1から精製する方法は、J. Biochem. 122, 330-336 (1997)に記載されている。

【0006】しかし、 $\beta$ -GalNAcaseを遺伝子工学技術を用いて製造する方法についてはまったく知られていなかった。すなわち、 $\beta$ -GalNAcaseをコードする遺伝子の単離もその構造解析も行われていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、 $\beta$ -GalNAcaseのアミノ酸配列ならびにこれをコードするヌクレオチド配列を明らかにするため、 $\beta$ -GalNAcaseを産生する細菌菌株である*Bacillus* sp. AT173-1の $\beta$ -GalNAcase遺伝子について鋭意研究を進めた結果、ついにその全ヌクレオチド配列を確定するとともに、それから推定される $\beta$ -GalNAcaseのアミノ酸配列を初めて明らかにすることに成功した。さらに $\beta$ -GalNAcase遺伝子を用いて $\beta$ -GalNAcaseを工業的に有利に製造する方法をも開発することに成功した。本発明はかかる事実に基づいて完成するに至ったものである。

【0008】従って、本発明の目的は、 $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有するDNAを提供することにある。本発明の別の目的は、このDNAを含む組換えDNAを提供することにある。本発明のさらに別の目的は、前記DNAを含む発現ベクターを提供することにある。本発明のなお別の目的は、この発現ベクターにより形質転換された形質転換体を提供することにある。本発明のなおさらに別の目的は、この形質転換体を用いて $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドを製造する方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、 $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離されたDNAであって、このポリペプチドは、糖鎖の非還元末端にある $\beta$ -グリコシド結合したN-アセチル-D-ガラクトサミンを遊離させるが、非還元末端にある $\beta$ -グリコシド結合したN-アセチル-D-グルコサミンは遊離させない、DNAが提供される。1つの実施態様において、前記ポリペプチドは、*Bacillus* (*Bacillus*) 属に属する細菌に由来する。1つの実施態様において、前記細菌は、*Bacillus* sp. (*Bacillus* sp.) AT173-1 (FERM P-15390)である。1つの実施態様において、前記ポリペプチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する。1つの実施態様において、前記ポリペプチドは、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸

配列において、1または数個のアミノ酸残基が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有する。

【0010】1つの実施態様において、前記DNAは、配列表の配列番号2に記載のヌクレオチド配列を含む。

【0011】1つの実施態様において、前記DNAは、配列表の配列番号2に記載のヌクレオチド配列において、1または数個のヌクレオチドが欠失、置換、または付加されたヌクレオチド配列を含み、かつ $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0012】1つの実施態様において、前記DNAは、配列表の配列番号2に記載のヌクレオチド配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得、かつ $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0013】本発明により、前記DNAを含む組換えDNAが提供される。

【0014】1つの実施態様において、前記組換えDNAは、宿主細胞において $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドを発現する能力を有する発現ベクターである。

【0015】1つの実施態様において、前記宿主細胞は、微生物細胞、動物細胞、植物細胞または昆虫細胞である。

【0016】本発明によれば、前記ベクターにより形質転換された形質転換体が提供される。

【0017】本発明によれば、前記形質転換体を培養する工程、得られる培養物より $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドを採取する工程を包含する、 $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するまたは $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼと機能的に同等の活性を有するポリペプチドの製造方法が提供される。

【0018】

【発明の実施の形態】本明細書において、「 $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ ( $\beta$ -GalNAcase)」とは、J. Biochem. 122, 330-336 (1997)に記載のように、以下の理化学的性質を有する酵素をいう。すなわち、本発明の $\beta$ -GalNAcaseは、糖鎖の非還元末端のN-アセチル-D-ガラクトサミニド結合を加水分解して、N-アセチルガラクトサミンを遊離させるが、糖鎖の非還元末端のN-アセチル-D-グルコサミニド結合には実質的に作

用せず、従ってN-アセチルグルコサミンを遊離させない。

【0019】 $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドは、天然型の $\beta$ -GalNAcaseのみならず、 $\beta$ -GalNAcase活性を有する限り、天然型の $\beta$ -GalNAcaseが有するアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸の欠失、置換、付加などによりアミノ酸配列が改変されたポリペプチドをも包含する。天然型の $\beta$ -GalNAcaseとしては、例えば、バシラス属に属する細菌由来の酵素が挙げられるが、これに限定されるものではない。天然型の $\beta$ -GalNAcaseは、例えば、細菌、酵母、放線菌、糸状菌、子囊菌、または担子菌などの微生物、あるいは植物または動物などの生物に由来し得る。

【0020】本明細書における「機能的に同等の活性を有するポリペプチド」は、天然型のポリペプチドとは構造的差異を有するにもかかわらず、天然型のポリペプチドと同等な機能を有すると認められるものをいう。

【0021】天然に生じる機能的に同等の活性を有するポリペプチドとしては、それをコードする遺伝子の多形および/または変異により、そのアミノ酸配列に変化が生じたポリペプチド、あるいは生成後のタンパク質の生体内および/または精製中の修飾反応などによって、そのアミノ酸配列中にアミノ酸の欠失、置換、付加などの変異が生じたポリペプチドであり、かつ変異を有しないポリペプチドと實質的に同等の生理的、および/または生物学的活性を示すものが挙げられる。

【0022】人為的に作製される機能的に同等の活性を有するポリペプチドの場合には、天然に生じるポリペプチドの場合よりも多様な変異が導入され得る。このようなポリペプチドは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて（例えば、制限酵素での消化、リガーゼでの連結、エキソヌクレアーゼでの消化、または部位特異的変異誘発などにより）目的のポリペプチドをコードするDNAを改変し、この改変されたDNAを発現させることにより得られ得る。得られたポリペプチドが天然型のポリペプチドと同等の活性を有するか否かは、その活性を測定することにより容易に決定され得る。

【0023】例えば、機能的に同等の活性を有するポリペプチドは、融合タンパク質であり得る。融合タンパク質は、目的のポリペプチドに、それが本来有する機能に加えて、新たな機能を与える目的で作製され得る。例えば、目的のタンパク質のN末端に他のタンパク質由来のN末端ペプチド鎖を付加することにより、目的のタンパク質の発現を増加させることが出来る。あるいは、目的のタンパク質のN末端またはC末端に適当なペプチド鎖を付加することにより、この付加したペプチド鎖に対する親和性を利用して目的のタンパク質の精製を容易にすることができる。

【0024】機能的に同等の活性を有するポリペプチドは、目的のタンパク質の部分であり得る。特定のタンバ

ク質において、その活性および/または機能のために必要とされる部分は、例えば、同様の活性/機能を有するポリペプチドについて得られている機能/活性に関する部分に関する知見に基づいて推定され得る。あるいは、この部分は、目的のポリペプチドの種々の変異体を上記のような当該分野において周知の技術を用いて作製し、それらの活性/機能を検討することにより決定され得る。

【0025】また、機能的に同等の活性を有するポリペプチドは、天然型のポリペプチドのアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸残基が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドであり得る。このようなポリペプチドは、当該分野において周知の技術を用いて、容易に作製し得る。

【0026】本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAは、たとえこのポリペプチドが同じアミノ酸配列を有する場合でも、以下の理由から、多様なヌクレオチド配列を有し得る。なぜなら、当業者に周知のように、各アミノ酸に対して1〜6種類づつのコドン（3つのヌクレオチドの組合せ）が存在するからである。

【0027】天然の生物または組換え体において、例えば、増殖中に自然に生じる変異が、それによりコードされるアミノ酸配列に変化を与えない場合、この変異はサイレント変異と呼ばれる。

【0028】遺伝子工学技術を用いてタンパク質を生産するときに、目的のタンパク質をコードする本来の遺伝子上で使用されているコドンが、使用される宿主においては使用頻度が低いものであるので、タンパク質の発現が低いことがある。このような場合には、コードされているアミノ酸配列に変化を与えることなく、コドンをその宿主において使用頻度が高いものに人為的に変更することにより、目的のタンパク質の発現を上昇させ得る。このような同じアミノ酸配列をコードするが異なるヌクレオチド配列を有する遺伝子は、当該分野に周知の技術を用いて容易に作製され得る。

【0029】さらに、本発明のDNAは、上記のような機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むDNAであり得る。

【0030】一般に、機能的に同等の活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、天然型のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と高い相同性を有し得る。従って、天然型のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を有するDNAとハイブリダイズし得、かつ $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドをコードするDNAが本発明に含まれることが意図される。また、高い相同性を有するヌクレオチド配列を有するDNAは、天然型のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に基づいて設計されたPCR反応用のプライマーを用いてPCR反応を行うことによっても得られ得る。

【0031】上記DNAを、当該分野で周知の方法を用いて、遺伝子工学技術を用いて加工することにより組換えDNAを得ることができる。組換えDNAは例えば、上記DNAを、他のDNAと連結することにより、あるいは改変（欠失、置換または付加など）することにより作製される。他のDNAの例としては、プラスミドベクターおよびファージベクターなどのベクターDNAならびに合成オリゴヌクレオチドなどが挙げられる。このようにして得られた組換えDNAは、例えば、単離されたDNAを増幅するために、同一のまたは類似のヌクレオチド配列を有する核酸を検出するためのプローブとして、あるいは単離されたDNAの細胞内での機能を解析するために有用であり得る。特に、コードされるポリペプチドが発現されるように構築された発現ベクターは、目的のポリペプチドの産生のために有用である。

【0032】以下、バシラスsp. AT173-1株由来の $\beta$ -GalNAcaseを例として、本発明を具体的に説明する。この菌株は、バシラスsp. AT173-1として表示され、通商産業省工技術院生命工学工業技術研究所に、寄託番号FERM P-15390のもとに、平成8年1月12日付けで寄託されている。

【0033】①まず、特願平8-12311号およびJ. Biochem. 122, 330-336 (1997)に記載の方法に従ってバシラスsp. AT173-1株を培養し、次いで、その培養液から $\beta$ -GalNAcaseを単離する。

【0034】②次に、精製された $\beta$ -GalNAcaseのN末端アミノ酸配列を決定する。N末端アミノ酸配列は、例えば精製 $\beta$ -GalNAcaseをエドマン分解法によるアミノ酸配列分析（例えば、プロテインシーケンサ492、アブライドバイオシステムズ社製を使用する）に供することにより決定される。この方法を用いて、通常10～20アミノ酸残基が決定される。

【0035】③こうして得られるN末端アミノ酸配列の情報に基づいて、ハイブリダイゼーション法のためのプローブまたはPCR法のためのプライマーを設計して、 $\beta$ -GalNAcase遺伝子をクローニングする。ハイブリダイゼーション法による遺伝子のクローニングは、例えば以下の工程を包含する。

【0036】a) N末端アミノ酸配列の情報に基づき、サザンハイブリダイゼーション用のプローブとしての合成オリゴヌクレオチドを設計し、そして合成する。

【0037】b) バシラスsp. AT173-1株のゲノムDNAを適当な制限酵素で完全に消化し、アガロースゲル電気泳動に供して分離し、次いでゲル中のDNAを常法に従いナイロンメンブレンにブロッティングする。

【0038】c) ブロッティングされたDNAフラグメントと、上記合成オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションを、当該分野において一般的に使用される条件下で行う。例えば、サケ精子DNAを含むフレハイブリダイゼーション溶液中でナイロンメンブレンをブ

ッキングし、次いでこれに $^{32}$ Pまたは非放射性ラベリングキットを用いて標識した合成オリゴヌクレオチドプローブを添加して、一晚インキュベートする。インキュベート後、このナイロンメンブレンを洗浄し、次いでX線フィルムに曝露してオートラジオグラフィーをとる。合成オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするDNAを検出して、ハイブリダイズするバンドのサイズに相当するDNAフラグメントをゲルから抽出および精製する。

【0039】d) 得られたDNAフラグメントを当業者に周知の方法によって、プラスミドベクターまたはファージベクターなどのベクターに組み込む。プラスミドベクターとしては、例えばpUC18、pUC19、pUC119、pTV118Nなどが好適に使用され得るが、特にこれらに限定されるものではない。

【0040】e) 組換えプラスミドを宿主細胞に導入することにより、宿主を形質転換する。宿主として大腸菌を使用する場合、形質転換能を有するものであれば野生株、変異株にかかわらず任意の大腸菌が使用可能である。プラスミドの導入は、当業者に周知の方法（例えば、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual」T. Maniatisら著、Cold Spring Harbor Laboratory(1982), p. 250に記載の方法）を用いることにより実施され得る。

【0041】f) ベクターを含む形質転換体を選別する。任意に、スクリーニングするべきクローン数を減少させるために、プラスミドベクターの特性を利用することによって、挿入されたDNAフラグメントを有する形質転換体を選別し得る。例えば、ベクターとしてpUC19を使用する場合、アンピシリンを含むプレート上でアンピシリン耐性を示すコロニーを選別し得る、あるいは、挿入フラグメントを有するクローンは、アンピシリン、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド(X-Gal)およびイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を含むプレート上で、アンピシリン耐性を示しかつ白色を呈するコロニーを選別することにより選別され得る。

【0042】g) 上記集団のなかから、目的のDNAフラグメントを含むベクターを有するクローンを選択する。クローンの選択は、使用されるベクターの種類によって、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーションなどによりおこなわれ得る。PCR法を用いて選択することも可能である。

【0043】g') あるいは、 $\beta$ -GalNAcase活性の発現をプレート上で直接検出することができる。検出は、4-メチル-ウンベリフェリル-N-アセチル- $\beta$ -ガラクトサミニド(MUF-GalNAc)を含むプレート上にコロニーを生育させ、UVを照射した際に蛍光を発するコロニーを選別することにより実施され得る。

【0044】h) 選別されたクローン中に挿入されているDNAフラグメントのヌクレオチド配列を、通常の方法

(例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)に記載のジデオキシチエンターミネーター法)により決定する。決定されたヌクレオチド配列から推定されるコードされるポリペプチドのアミノ酸配列およびそれから算出される分子量と、以前に決定した $\beta$ -GalNAcaseのN末端アミノ酸配列およびこの酵素の分子量とを比較することなどによって、得られたDNAフラグメントが目的の $\beta$ -GalNAcase遺伝子の全部またはその一部を含むか否かを決定する。こうして得られる $\beta$ -GalNAcase遺伝子を含むDNAフラグメントのヌクレオチド配列から、 $\beta$ -GalNAcase遺伝子の構造およびこれによりコードされる $\beta$ -GalNAcaseの全アミノ酸配列を決定する。

【0045】目的のDNAフラグメントを含むベクターが $\beta$ -GalNAcase遺伝子の全長を含まない場合は、得られたDNAフラグメントの全部または一部をプローブとして用い、*Bacillus* sp. AT173-1株のゲノムDNAを他の制限酵素で消化したものについて上記のように再度スクリーニングして、残りの部分を得、これを既に得られていた部分と連結することにより、目的の $\beta$ -GalNAcase遺伝子の全長を得ることができる。

【0046】以上のようにして得られる、*Bacillus* sp. AT173-1株の産生する $\beta$ -GalNAcaseをコードする遺伝子の全ヌクレオチド配列およびこのヌクレオチド配列から推定される $\beta$ -GalNAcaseのアミノ酸配列を、配列番号2および配列番号1にそれぞれ示す。本発明のDNAが有するヌクレオチド配列およびこれによりコードされるポリペプチドが有するアミノ酸配列が、配列番号1および配列番号2に記載の配列を含むが、これらに限定されないことは、上記から明らかである。

【0047】本発明の $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドは、 $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列(すなわち、 $\beta$ -GalNAcase遺伝子)を含むDNAを用いて、例えば以下のように生産され得る。

【0048】まず、 $\beta$ -GalNAcase遺伝子を含む発現ベクターを構築する。発現ベクターとしては、使用される宿主に適合性の任意のものが使用され得る。発現ベクターは、プラスミド、ファージ、またはウイルスなどに由来し得る。発現ベクターにおいて、使用される宿主中で機能し得るプロモーターが、 $\beta$ -GalNAcaseをコードするヌクレオチド配列を含むDNAに作動可能に連結され得る。 $\beta$ -GalNAcase遺伝子が本来有するプロモーターが、使用される宿主中で機能し得る場合は、これを使用し得る。発現ベクターは、転写調節配列、転写ターミネーター、翻訳調節配列、選択マーカー、複製起点などをさらに有し得る。

【0049】上記発現ベクターを用いて適切な宿主を形質転換し、得られる形質転換体を通常用いられている条件で培養し、そして培養物から $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドを回収することによって、 $\beta$ -GalNAcase

活性を有するポリペプチドを生産させることができる。大腸菌などを宿主として使用する場合、このポリペプチドは、封入体(inclusion body)の形で生産され得る。また、宿主としては微生物細胞、動物細胞、植物細胞など、遺伝子組換えの宿主として使用可能な任意の宿主を用いることができる。

【0050】発現は、例えば、 $\beta$ -GalNAcase活性を測定することにより確認され得る。活性の測定は、例えば、形質転換細胞の抽出液を酵素液として、J. Biochem. 122, 330-336 (1997)に記載の方法により行うことができる。あるいは、発現の確認は、 $\beta$ -GalNAcaseに対する抗体を用いても行われ得る。一旦目的の $\beta$ -GalNAcaseの発現が確認されれば、培地組成、培地のpH、培養温度、インデューサーの使用量および使用時間、培養時間などについて $\beta$ -GalNAcaseの発現のための最適条件を決定することによって、効率良く $\beta$ -GalNAcaseを生産させることができる。

【0051】 $\beta$ -GalNAcaseは、形質転換体の培養物から、通常の方法を用いて精製される。形質転換体が大腸菌である場合、 $\beta$ -GalNAcaseは細胞内に蓄積され得る。細胞内に蓄積されたポリペプチドは、以下のように精製される。培養終了後遠心分離によって形質転換体を集め、これを超音波処理などにより破碎した後、これを遠心分離することなどによって、無細胞抽出液を得る。これを、塩析、あるいはイオン交換、ゲル濾過、疎水、またはアフィニティーなどの各種クロマトグラフィーなどの一般的なタンパク質精製法の組合せに供することにより、目的のポリペプチドを精製することができる。用いる形質転換体によっては発現産物が形質転換体外に分泌される。このような場合は、ポリペプチドは、細胞を除去した培養上清から同様に精製され得る。

【0052】形質転換体による $\beta$ -GalNAcaseの発現量が高い場合は、たとえこのポリペプチドが菌体内に生産され、かつ菌体内の種々の他のポリペプチドと共存しても、これらは目的の $\beta$ -GalNAcaseの量に比べて微量であるので、 $\beta$ -GalNAcaseの精製は容易である。また、 $\beta$ -GalNAcaseが菌体外に分泌される場合は、培養上清中には培地成分(および宿主細胞により分泌される通常少量のタンパク質)などが含まれるが、これには $\beta$ -GalNAcaseの精製の妨げとなるようなタンパク質成分が極めて少量しか含まれないので、分泌生産は、この酵素の本来の生産株である*Bacillus* sp. AT173-1株の培養物から $\beta$ -GalNAcaseを精製するためには必要とされる複雑な分離精製操作を必要としないという利点を与える。

【0053】また、例えば宿主が大腸菌などである場合、発現産物は不溶性の封入体として形成され得る。この場合には、培養終了後遠心分離によって菌体を集め、これを超音波処理などによって破碎した後、遠心分離などを行うことにより、封入体を含む不溶性画分を集める。封入体を洗浄した後、これを通常用いられるタンバ



ク質可溶化剤（例えば、尿素またはグアニジン塩酸など）で可溶化し、必要に応じてこれをイオン交換、ゲル濾過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィーにより精製した後、透析法あるいは希釈法などを用いるリフォールディング操作を行うことによって、活性を有するポリペプチドを得ることができる。必要に応じてこの標品を更に各種クロマトグラフィーによって精製すれば、高純度の $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドを得ることができる。

【0054】目的のポリペプチドがアフィニティー精製を可能にするような融合タンパク質の形態で発現される場合、発現産物の精製はアフィニティークラムを使用し、容易に実施され得る。

【0055】以上で詳細に説明したように、本発明により、*Bacillus* sp. AT173-1株由来の $\beta$ -GalNAcaseの一次構造およびこれをコードする遺伝子の構造が提供される。これにより、 $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドの遺伝子工学技術を用いる製造が可能となる。本発明の遺伝子工学技術を用いる製造法を用いることにより、安価に高純度な $\beta$ -GalNAcase活性を有するポリペプチドを得ることが可能となる。

【0056】以下、実施例を挙げて本発明を具体的に示すが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0057】

【実施例】

（実施例1： $\beta$ -GalNAcase遺伝子のクローニング）

（1）ゲノムDNAの抽出精製

$\beta$ -GalNAcaseの生産菌株である*Bacillus* sp. AT173-1株（FERM P-15390）を Nutrient broth（Difco社製）液体培地5mlに接種し、37°Cで16時間培養した後、この培養液を、同培地50 mlを含む坂口フラスコあたり1 mlずつ接種し、そしてさらに8時間振とう培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を集め、得られた菌体を1×SSC（0.15M NaCl、0.015M Na<sub>2</sub>citrate pH7.0）で1回、saline EDTA（0.15M NaCl、0.1M EDTA pH8.0）で2回洗浄した。

【0058】菌体を25 mlのsaline EDTA 溶液に懸濁後、これにリゾチム溶液（saline EDTA 溶液中10 mg/ml）を1 ml添加し、37°Cで10分間振とうした。次いで、これに25%SDSを1 ml加え、37°Cでさらに10分間振とうした後、5M NaClO<sub>4</sub>を6.2 ml加えた。この溶液に等容のフェノール／クロロホルムを加えて、室温にて穏やかに撹拌し、次いで、10,000 rpmで10分間遠心分離し、そして上の水層を回収した。（上記の操作を、以下「フェノール／クロロホルム処理」と略記する）、さらにこのフェノール／クロロホルム処理を2回繰り返した後、回収した上の水層に2倍容量の冷エタノールをゆっくり加えてDNAを析出させた。これをガラス棒に巻き取り、70%の冷エタノール溶液で洗浄後、風乾した（上記の操

作を、以下「エタノール沈殿」と略記する）。乾燥したDNAを0.1×SSC 25mlを加えることにより溶解し、これにさらに10×SSCを5ml、RNaseA（5 mg/ml）を250  $\mu$ l（終濃度50  $\mu$ g/ml）を添加し、そして37°Cで30分間保温した。保温後、この液に対して、フェノール／クロロホルム処理およびそれに続くエタノール沈殿を行った。得られた沈殿を5 mlの0.1×SSCに溶解して、この溶液をTE緩衝液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH8.0）に対して48時間透析を行った後、この液に対してフェノール／クロロホルム処理およびそれに続くエタノール沈殿を行った。遠心分離によりDNAを回収し、沈殿をTE緩衝液に溶解してゲノムDNA溶液とした。

【0059】この操作により得られたゲノムDNAの濃度はその吸光度から161  $\mu$ g/mlと算出された。

【0060】（2） $\beta$ -GalNAcaseのN末端アミノ酸配列の決定

J. Biochem. 122, 330-336（1997）に記載の方法に従って精製した $\beta$ -GalNAcaseを、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により分離後、PVDFメンブレン（Bio-Rad社製）にトランスファーし、このメンブレンをペプチドシークエンサー（プロテインシーケンサ492、アプライドバイオシステムズ社製）に供してN末端アミノ酸配列を決定した。決定したN末端アミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0061】（3）DNAプローブの作製および標識

上記（2）で決定したN末端アミノ酸配列（配列番号4）に基づいて2種類のDNA プローブ、プローブ1（配列番号5）およびプローブ2（配列番号6）を設計した。合成されたオリゴヌクレオチド300 pmolをDIGオリゴヌクレオチド3'末端標識キット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて、添付のマニュアルに従って標識した。

【0062】（4）*Bacillus* sp. AT173-1株のDNAのサザンブロッティング

上記（1）で調製した約0.36  $\mu$ gの*Bacillus* sp. AT173-1株のゲノムDNAを各々10単位の制限酵素EcoRI、HindIII、およびPstI（それぞれ、宝酒造社製）を用いて37°Cで一晩反応させ完全に消化した。反応液に対してフェノール／クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行った後、遠心分離によりDNAの沈殿を回収した。これをTE緩衝液に溶解し、1%のアガロースゲル（ニッポンジーン社製）を用いて電気泳動することにより分離した。このゲルをエチジウムブロマイドで染色した後、0.25 MのHCl中で約15分間、次いで変性溶液（1.5M NaCl、0.5M Tris-HCl pH7.2、1mM EDTA）中で15分ずつ2回振とうした。変性したDNAを、このゲルから、20×SSCをトランスファーバッファーとしてHybond-Nナイロンメンブレン（Amersham 社製）に一晩ブロッティングした。ブロッティング後、メンブレンを60°Cで30分間乾燥させ、UVトランスイルミネーターで5分間照射することにより、DNAをメンブレンに固定した。

【0063】(5) サザンハイブリダイゼーション  
上記(4)で調製したメンブレンを、20 mlのハイブリダイゼーション液(5×SSC、1 %ブロッキング液(Amersham社製)、0.1 %ラウロイルサルコシン、0.02 % SDS)中、68℃で1時間プレハイブリダイゼーションした。その後、この液に上記(3)で作製した標識プローブを10 pmol/ml になるように加え、37℃で一晩ハイブリダイズさせた。

【0064】(6)  $\beta$ -GalNAcase遺伝子を含むDNAフラグメントの検出  
ハイブリダイゼーション後のメンブレンを37℃で、2×SSC、0.1 % SDS 中で5分間、続いて0.1×SSC、0.1 % SDS 中で5分間、それぞれ2回ずつ洗浄し、その後DIG発光検出キット(ペーリンガー・マンハイム社製)を用いて検出反応を行った。反応後、約4時間、FUJI X-RAYFILM(富士フイルム社製)に露光した。プローブ2を用いた時、EcoRI処理したDNAについては4 kb付近、HindIII処理したDNAについては3.5 kb付近、PstI処理したDNAについては0.7 kb付近にシグナルが検出された。

【0065】(7) パシラスsp. AT173-1株の遺伝子ライブラリーの作製  
上記(1)で調製したゲノムDNA(1.61  $\mu$ g/ml)を制限酵素EcoRIおよびHindIIIのそれぞれで上記(4)と同様に消化し、次いで電気泳動により分離した。エチジウムブロマイドによる染色後、上記(6)でシグナルが得られた付近の分子量を有するDNAをゲルから切り出し、GENE CLEAN KIT II(BIO 101社製)を用いて精製した。

【0066】約3  $\mu$ gのpUC18および19をそれぞれ、制限酵素EcoRIおよびHindIIIのそれぞれで上記(4)と同様に反応させた。反応液に対してフェノール/クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行なった。遠心分離によりDNAの沈殿を回収し、これを10  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。次にこの10  $\mu$ lのpUC18およびpUC19の溶液に27単位のCalf intestine alkaline phosphatase(宝酒造社製)を添加して37℃で30分間処理し、フェノール/クロロホルム処理およびエタノール沈殿を行ない、そして遠心分離によりDNAを回収して10  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。

【0067】上記で得られたベクター溶液2  $\mu$ lとDNAフラグメント4  $\mu$ lとを混合し、DNA Ligation Kit(宝酒造社製)を用いて、16℃で一晩反応を行った。反応液10  $\mu$ lを用いて E. coli JM109 Competent cell(宝酒造社製)を形質転換した。形質転換された細菌の懸濁液を、X-galアンビシリン LB寒天培地(1% Bacto tryptone(Difco社製)、0.5% Yeast extract(Difco社製)、1% NaCl、40  $\mu$ g/ml X-gal、40  $\mu$ g/ml IPTG、50  $\mu$ g/ml Ampicillin、1.2% Agar)上に播き、そして37℃で20時間培養した。

【0068】(8) コロニーハイブリダイゼーション  
上記(7)で得られたプレート上のコロニーを、1枚の

Hybond-N Gridded membrane(Amersham社製)と1分間、別のメンブレンと同様にして2分間、それぞれ接触させて、2枚のメンブレンに移し取った。その後、これらを変性溶液を含んだ濾紙上で5分間、次いで中和溶液を含んだ濾紙上で5分間放置し、風乾させ、次いでこのメンブレンにUVを1分間照射することによりコロニー中のDNAを固定した。メンブレンを2×SSC、0.1 % SDS中で、60℃で30分間保温して、メンブレンに付着した菌体を洗浄した後、上記(5)および(6)と同様にハイブリダイゼーションおよび検出を行った。プローブとしては、プローブ2のみを用いた。

【0069】19個のポジティブクローンが得られたので、それらをそれぞれ、40  $\mu$ g/mlの4-methyl-umbelliferyl-N-acetyl-galactosamide(MUF-GalNAc)を含むアンビシリンLB寒天培地上で培養した。その結果、EcoRIフラグメントが挿入されたコロニーの1つがUVを照射した場合に蛍光を発したので、これを3 mlのアンビシリンLB液体培地に植菌し、一晩培養して、常法によりプラスミドDNAを抽出した。

【0070】(9) 挿入フラグメントの縮小化  
上記(8)で抽出したプラスミドDNA約3  $\mu$ gを制限酵素EcoRIで上記(4)と同様に消化し、電気泳動したところ、約4.3 kbおよび約3.5 kbの2つの挿入DNAフラグメントが確認された。そこで、アガロースゲルからこれら2つのDNAを含むゲルを別々に切り出し、GENE CLEAN KIT IIを用いて精製し、これをEcoRI消化したpUC19とライゲーションした。この反応液を用いて上記(7)と同様に形質転換し、MUF-GalNAcアンビシリンLB寒天培地上で37℃、12時間培養した。次いで、プレートにUVを照射して、活性を検出したところ、約4.3 kbの挿入DNAフラグメントを有するクローン(p1943)に活性が見られた。この4.3 kbのEcoRIフラグメントをHpaIおよびPvuIIで制限酵素処理したところ、それぞれ約2.4 kbおよび約1.9 kbの2つのフラグメント、ならびに約2.2 kbおよび約2.1 kbの2つのフラグメントが生じた。これらのフラグメントをEcoRIおよびHincIIで二重消化したpUC19とライゲーションし、形質転換し、そしてMUF-GalNAcアンビシリンLB寒天培地上で、37℃、12時間培養した後、UVを照射して、活性を検出した。その結果、PvuIIで消化した際に生じた約2.2 kbのフラグメントを有するクローン(p1920)にのみ活性が検出された。プラスミドp1920の構造を図1に示す。

【0071】(10) ヌクレオチド配列の決定  
上記(9)で活性のを示したクローンが有する約2.2 kbのEcoRI-PvuIIフラグメントをEcoRIおよびSmaIで消化したpUC19とライゲーションし、プラスミド(p1920S)を得た。次いで、これを制限酵素XbaIおよびPstIで消化し、Kilo-Sequence用 Deletion Kit(宝酒造社製)を用いて、添付のマニュアルに従って処理し、そして挿入フラグメントがPvuII側から欠失された各種クローンを得

た。これらの中から適当な長さのフラグメントを有するクローンをいくつか選択し、それらについてA.L.F. DN A Sequencer Express (ファルマシア社製)を用いてヌクレオチド配列を決定した。あるいは配列決定は、適当な制限酵素切断部位からも実施した。配列決定の手順を図2および3に模式的に示す。

【0072】(11)  $\beta$ -GalNAcase遺伝子構造  
上記(10)で決定したヌクレオチド配列を、配列番号3に示す。 $\beta$ -GalNAcaseをコードすると考えられる最大のオープンリーディングフレーム(ORF)に対応する領域のヌクレオチド配列を配列番号2に示す。配列番号のORFにコードされるポリペプチドの推定アミノ酸配列を、配列番号1および配列番号3に示す。上記(2)で決定したN末端アミノ酸配列(配列番号4)と上記推定アミノ酸配列を比較したところ、このN末端アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列のすぐ5'側に、翻訳開始コドンと考えられるATGが(配列番号3、ヌクレオチド219~221位)、さらにその上流にリボソーム結合部位であるShine-Dalgarno配列(配列番号3、ヌクレオチド216~220位)、ならびにプ17モーター配列(-35および-10領域、それぞれ配列番号3、ヌクレオチド61~66位および91~96位)と考えられる配列が存在した。

【0073】(実施例2:  $\beta$ -GalNAcaseの発現)

(1) プロモーター活性

pUC19のlacプロモーターに対して正方向で $\beta$ -GalNAcase遺伝子が挿入されているプラスミドp1920および、lacプ17モーターに対して逆方向でこの遺伝子が挿入されているプラスミドp1820(図1)を保持するE.coli JM109/p1920およびE.coli JM109/p1820の両方が酵素活性を示したので、 $\beta$ -GalNAcase遺伝子自体のプ17モーター、またはこの遺伝子を含むDNAフラグメントに存在するプ17モ

ーター様配列が、大腸菌の中で認識されて、転写および翻訳が起こったと考えられた。

【0074】(2) IPTGによる発現の誘導

E.coli JM109/p1920に対するIPTGの添加の影響を、IPTGを添加するかまたは添加しないで培養した菌体を破碎して、SDS-PAGEを行うことにより検討した。IPTGを添加して培養した菌体由来のサンプルについては、 $\beta$ -GalNAcaseタンパク質と考えられる約63kDaの位置のバンドの強度が、添加していない場合に比較して特異的に濃くなっていた。このことから、IPTGによる $\beta$ -GalNAcaseタンパク質の発現の誘導が示された。一方、E.coli JM109/p1820についても同様の実験を行った。その結果、E.coli JM109/p1920を培養した時と同じ位置のタンパク質の発現が、E.coli JM109/p1820についても観察されたが、IPTGの添加による発現量の増加は見られなかった。

【0075】(3)  $\beta$ -GalNAcase活性の測定

大腸菌E.coli JM109/p1920の無細胞抽出液中の酵素活性を、p-nitrophenyl- $\beta$ -N-acetyl-galactosaminideまたはp-nitrophenyl- $\beta$ -N-acetyl-glucosaminideを基質として測定した。結果を表1に示す。p-nitrophenyl- $\beta$ -N-acetyl-glucosaminideを基質として用いた際に示される $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ( $\beta$ -GlcNAcase)としての活性は、p-nitrophenyl- $\beta$ -N-acetyl-galactosaminideを基質として用いた際に示される $\beta$ -GalNAcaseとしての活性の約0.12%であった。このことから、クローン化されたDNAフラグメントにコードされるポリペプチドが、目的の $\beta$ -GalNAcaseであることが判明した。

【0076】

【表1】

		GalNAcase活性(U/ml)	GlcNAcase活性(U/ml)
E.coli JM109 / pUC19	菌体抽出液	0.005	0
	培養上清	0	-
E.coli JM109 / p1920	菌体抽出液	51.72	0.073
	培養上清	0.07	-
E.coli JM109 / p1820	培養上清	0.038	-

【0077】

【発明の効果】本発明により、 $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼのアミノ酸配列およびこの酵素をコードするヌクレオチド配列が初めて明らかとなり、これにより、遺伝子工学技術を用いて $\beta$ -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性を有するポリペプチドを工業的に有利に製造することが可能になった。

【0078】

【配列表】

【0079】

【配列番号1】

配列の長さ: 546

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

## 配列:

Met Ala Asn Ile Asp Phe Gln Leu Ser Asp Ser Leu Glu Lys Ile Phe  
 1 5 10 15  
 Pro Asp Thr Pro Pro Asn Thr Ile Pro Met Asn Asp Ile Ser Ile Phe  
 20 25 30  
 Gln Asn Glu Gln Phe Ser Phe Gln Leu Ala Tyr Arg Ser Asn Asp Asn  
 35 40 45  
 Lys Lys Ile His Ile Lys Val Gly Ala Asp Asp Thr Leu Leu Thr Ser  
 50 55 60  
 Ile Ser His Val Lys Lys Val Pro Ser Asn Leu Pro Ala Tyr Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Ser His Asp Glu Asn Tyr Leu Ser Thr Glu Pro Gly Leu Phe Pro Asp  
 85 90 95  
 Leu Leu Glu Pro Val Thr Ala Glu Gly Ile Asp Leu Glu Thr Asp Gly  
 100 105 110  
 Trp Asn Ser Ile Trp Ile Asp Val Cys Pro Ser Val Gly Ala Val Gly  
 115 120 125  
 Glu Lys Thr Leu Thr Leu His Ile Thr Asp Glu Ser His Gln Ser Ile  
 130 135 140  
 Tyr Glu Gln Ser Leu Ser Ile Arg Val Ile Pro His Asn Leu Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Gln Lys Leu Ile His Thr Gln Trp Phe His Thr Asp Cys Leu Ala Asn  
 165 170 175  
 Tyr Tyr Asn Ala Glu Val Phe Ser Glu Glu His Trp Arg Ile Ile Glu  
 180 185 190  
 Asn Phe Ile Arg Thr Ala Ser Glu Asn Gly Ile Asn Met Ile Leu Thr  
 195 200 205  
 Pro Ile Phe Thr Pro Pro Leu Asp Thr Lys Val Gly Gly Glu Arg Thr  
 210 215 220  
 Thr Val Gln Leu Val Gln Ile Ser Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Glu Phe  
 225 230 235 240  
 Asp Phe Ser Leu Leu Arg Lys Trp Leu Asp Ile Cys Lys Arg Asn Gly  
 245 250 255  
 Ile Asn Tyr Ile Glu Ile Ala His Leu Phe Thr Gln Trp Gly Ala Glu  
 260 265 270  
 Phe Thr Pro Lys Ile Met Val Met Glu Asp Gly Val Leu Phe Arg Lys  
 275 280 285  
 Phe Gly Trp Asp Val Ala Ala Asp Ser Lys Glu Tyr Arg Leu Leu Leu  
 290 295 300  
 Glu Ser Phe Leu Pro Ala Leu Thr Glu Phe Leu Lys Ala Asn Trp Glu  
 305 310 315 320  
 Ser Glu Lys Val Tyr Phe His Ile Ser Asp Glu Pro Asn Glu Ser Asn  
 325 330 335  
 Val Val Thr Tyr Ser Lys Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Tyr Leu Lys  
 340 345 350  
 Asp Phe Ile Ile Ile Asp Ala Leu Ser Asp Tyr Ser Phe Tyr Gln Lys  
 355 360 365  
 Gly Ile Val Thr Lys Pro Ile Val Ala Asn Asp His Ile Gln Thr Tyr  
 370 375 380  
 Ile Asp His Asn Glu Pro Asn Leu Trp Thr Tyr Tyr Cys Cys Ala Gln

[illegible]

【 〇 〇 8 〇 】

【配列番号2】

配列の長さ : 1641

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列：

ATGGCTAATA TTGATTTTCA ATTATCGGAT TCA  
TTAGAAA AAATATTTCC TGATACCCCA 60  
CCAAATACGA TACCTATGAA TGATATTTCT ATT  
TTTCAAA ATGAACAATT TTCATTTCAA 120  
CTCGCGTATC GATCTAATGA TAATAAAAAAG ATA  
CACATTA AAGTAGGAGC GGATGATACA 180  
CTCCTAACAT CCATAAGCCA TGTGAAAAAAG GTG  
CCTTCTA ATCTACCAGC CTATCCCGAT 240  
TCACACGATG AGAATTACCT TTCGACTGAA CCA  
GGGTTAT TTCCCGATTT ACTGGAGCCT 300  
GTAACCGCTG AAGGGATTGA CCTAGAAACA GAT  
GGCTGGA ACTCTATATG GATTGATGTT 360  
TGTCOAAGTG TAGGTGCTGT GGGAGAAAAG ACG  
TTAACAT TACATATTAC TGATGAAAGT 420  
CATCAATCCA TTTACGAACA ATCTTTTATCA ATT  
CGAGTCA TCCCTCACAA TTTACCTGAA 480  
CAAAAACATA TACATACTCA ATGGTTTCAT ACA  
GATTGTT TAGCGAATTA TTATAATGCA 540  
GAAGTTTTTT CAGAAGAACA TTGGCGAATC ATC  
GAAAAAT TCATTTCGTAC AGCAAGTGAG 600  
AATGGAATCA ATATGATCCT TACTCCAATT TTT  
ACTCCTC CATTAGATAC GAAAGTTGGA 660  
GGCGAGCGAA CAACGGTTCA ACTCGTGCAA ATT  
TCTTATG AAAATGGTAA GTATGAGTTT 720

GATTTTTCAT TACTGAGAAA ATGGCTAGAT ATA  
 TGTAAC GCAACGGAAT TAATTACATT 780  
 GAGATCGCCC ATCTATTTAC ACAATGGGGT GCC  
 GAGTTTA CTCCTAAAAT AATGGTGATG 840  
 GAAGATGGGG TTCTTTTATAG AAAATTCGGT TGG  
 GATGTAG CTGCTGATAG CAAAGAATAT 900  
 CGATTGTTAT TAGAATCGTT TCTCCCTGCT TTG  
 ACTGAGT TTTTAAAAGC AAATTGGGAG 960  
 TCGGAGAAAG TTTATTTTCA TATATCCGAT GAA  
 CCAAACG AATCAAATGT AGTTACTTAT 1020  
 TCAAAAGCGA AAAAATTGGC AGAACCGTAT CTG  
 AAAGATT TTATAATTAT AGATGCATTA 1080  
 AGTGATTATT CATTCTACCA AAAAGGCATT GTA  
 ACGAAGC CTATAGTCGC AAATGACCAT 1140  
 ATTCAAACAT ATATCGATCA TAATGAACCA AAT  
 TTATGGA CCTATTATTG CTGTGCCCAA 1200  
 AATCAAAAAG TAAGCAATCG ATTTATGGCG ATG  
 CCTTCAG CAAGAAATCG AATTATCGCT 1260  
 ACACAATTAT TCAAATACGA CATCGAAGGA TTT  
 CTTCAAT GGGGATATAA TTTTACAAAC 1320  
 AGTCAGTACT CGATAGAGCC AATTGATCCT TAT  
 GTCATAA CGGATGCAAA AAATGCTTTT 1380  
 CCTTCAGGTG ATACATTCCT CGTCTATCCT GGG  
 AAAGATG GAGAAGCAAT TCCGTCCATA 1440  
 CGCTCCCGAG TCTTTTATCA CGCTTTGCAA GAT  
 TTGCGCG CGTTTCAATG GCTAGAACAA 1500  
 TTAAGAGGAA AAGATTTTGT TTTGAATATA ATT  
 GAAAAAT ATCAAACAAT CACTTTCTCT 1560  
 GATTATCCAA AAGAGAAGGA ATATATTTTC CAG  
 ATTAGAG AAGAGATTAA TAGGGAAATA 1620  
 GAAAAAGCGC TAAGTGAATA A

1641

【0081】

【配列番号3】

配列の長さ: 2231

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

配列:

CATGAATGGC TTCAGCACCT TTCATACAG TTTGTAGGT TTTATTTCT TGTATTTCAA 60  
 TTGACAGTCA CCCTTTTTT ATCACTTTT TATATTTTC CCAATTGCTA AAAATCTTCA 120  
 AAGGAATTAA TATGTTTTA TCACACTATT TTACTATGTG AACGAATCAA ACTAGTTTTT 180  
 ACTATAACAT CAATAGATAG AAATTGGAGG ACTTTATA ATG GCT AAT ATT GAT TTT 236  
 Met Ala Asn Ile Asp Phe  
 1 5  
 CAA TTA TCG GAT TCA TTA GAA AAA ATA TTT CCT GAT ACC CCA CCA AAT 284  
 Gln Leu Ser Asp Ser Leu Glu Lys Ile Phe Pro Asp Thr Pro Pro Asn  
 10 15 20  
 ACG ATA CCT ATG AAT GAT ATT TCT ATT TTT CAA AAT GAA CAA TTT TCA 332  
 Thr Ile Pro Met Asn Asp Ile Ser Ile Phe Gln Asn Glu Gln Phe Ser  
 25 30 35  
 TTT CAA CTC GCG TAT CGA TCT AAT GAT AAT AAA AAG ATA CAC ATT AAA 380

Phe	Gln	Leu	Ala	Tyr	Arg	Ser	Asn	Asp	Asn	Lys	Lys	Ile	His	Ile	Lys	
40						45				50						
GTA	GGA	GCG	GAT	GAT	ACA	CTC	CTA	ACA	TCC	ATA	AGC	CAT	GTG	AAA	AAG	428
Val	Gly	Ala	Asp	Asp	Thr	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Ser	His	Val	Lys	Lys	
55					60				65					70		
GTG	CCT	TCT	AAT	CTA	CCA	GCC	TAT	CCC	GAT	TCA	CAC	GAT	GAG	AAT	TAC	476
Val	Pro	Ser	Asn	Leu	Pro	Ala	Tyr	Pro	Asp	Ser	His	Asp	Glu	Asn	Tyr	
					75				80					85		
CTT	TCG	ACT	GAA	CCA	GGG	TTA	TTT	CCC	GAT	TTA	CTG	GAG	CCT	GTA	ACC	524
Leu	Ser	Thr	Glu	Pro	Gly	Leu	Phe	Pro	Asp	Leu	Leu	Glu	Pro	Val	Thr	
					90				95					100		
GCT	GAA	GGG	ATT	GAC	CTA	GAA	ACA	GAT	GGC	TGG	AAC	TCT	ATA	TGG	ATT	572
Ala	Glu	Gly	Ile	Asp	Leu	Glu	Thr	Asp	Gly	Trp	Asn	Ser	Ile	Trp	Ile	
					105				110					115		
GAT	GTT	TGT	CCA	AGT	GTA	GGT	GCT	GTG	GGA	GAA	AAG	ACG	TTA	ACA	TTA	620
Asp	Val	Cys	Pro	Ser	Val	Gly	Ala	Val	Gly	Glu	Lys	Thr	Leu	Thr	Leu	
					120				125					130		
CAT	ATT	ACT	GAT	GAA	AGT	CAT	CAA	TCC	ATT	TAC	GAA	CAA	TCT	TTA	TCA	668
His	Ile	Thr	Asp	Glu	Ser	His	Gln	Ser	Ile	Tyr	Glu	Gln	Ser	Leu	Ser	
					135				140					145		
ATT	CGA	GTC	ATC	CCT	CAC	AAT	TTA	CCT	GAA	CAA	AAA	CTA	ATA	CAT	ACT	716
Ile	Arg	Val	Ile	Pro	His	Asn	Leu	Pro	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	His	Thr	
					155				160					165		
CAA	TGG	TTT	CAT	ACA	GAT	TGT	TTA	GCG	AAT	TAT	TAT	AAT	GCA	GAA	GTT	764
Gln	Trp	Phe	His	Thr	Asp	Cys	Leu	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Val	
					170				175					180		
TTT	TCA	GAA	GAA	CAT	TGG	CGA	ATC	ATC	GAA	AAT	TTC	ATT	CGT	ACA	GCA	812
Phe	Ser	Glu	Glu	His	Trp	Arg	Ile	Ile	Glu	Asn	Phe	Ile	Arg	Thr	Ala	
					185				190					195		
AGT	GAG	AAT	GGA	ATC	AAT	ATG	ATC	CTT	ACT	CCA	ATT	TTT	ACT	CCT	CCA	860
Ser	Glu	Asn	Gly	Ile	Asn	Met	Ile	Leu	Thr	Pro	Ile	Phe	Thr	Pro	Pro	
					200				205					210		
TTA	GAT	ACG	AAA	GTT	GGA	GGC	GAG	CGA	ACA	ACG	GTT	CAA	CTC	GTG	CAA	908
Leu	Asp	Thr	Lys	Val	Gly	Gly	Glu	Arg	Thr	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Gln	
					215				220					225		
ATT	TCT	TAT	GAA	AAT	GGT	AAG	TAT	GAG	TTT	GAT	TTT	TCA	TTA	CTG	AGA	956
Ile	Ser	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Glu	Phe	Asp	Phe	Ser	Leu	Leu	Arg	
					235				240					245		
AAA	TGG	CTA	GAT	ATA	TGT	AAA	CGC	AAC	GGA	ATT	AAT	TAC	ATT	GAG	ATC	1004
Lys	Trp	Leu	Asp	Ile	Cys	Lys	Arg	Asn	Gly	Ile	Asn	Tyr	Ile	Glu	Ile	
					250				255					260		
GCC	CAT	CTA	TTT	ACA	CAA	TGG	GGT	GCC	GAG	TTT	ACT	CCT	AAA	ATA	ATG	1052
Ala	His	Leu	Phe	Thr	Gln	Trp	Gly	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	Lys	Ile	Met	
					265				270					275		
GTG	ATG	GAA	GAT	GGG	GTT	CTT	TTT	AGA	AAA	TTC	GGT	TGG	GAT	GTA	GCT	1100
Val	Met	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Phe	Arg	Lys	Phe	Gly	Trp	Asp	Val	Ala	
					280				285					290		
GCT	GAT	AGC	AAA	GAA	TAT	CGA	TTG	TTA	TTA	GAA	TCG	TTT	CTC	CCT	GCT	1148
Ala	Asp	Ser	Lys	Glu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Ser	Phe	Leu	Pro	Ala	
					295				300					305		

TTG ACT GAG TTT TTA AAA GCA AAT TGG GAG TCG GAG AAA GTT TAT TTT	1196
Leu Thr Glu Phe Leu Lys Ala Asn Trp Glu Ser Glu Lys Val Tyr Phe	
315 320 325	
CAT ATA TCC GAT GAA CCA AAC GAA TCA AAT GTA GTT ACT TAT TCA AAA	1244
Ile Ile Ser Asp Glu Pro Asn Glu Ser Asn Val Val Thr Tyr Ser Lys	
330 335 340	
GCG AAA AAA TTG GCA GAA CCG TAT CTG AAA GAT TTT ATA ATT ATA GAT	1292
Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Tyr Leu Lys Asp Phe Ile Ile Ile Asp	
345 350 355	
GCA TTA AGT GAT TAT TCA TTC TAC CAA AAA GGC ATT GTA ACG AAG CCT	1340
Ala Leu Ser Asp Tyr Ser Phe Tyr Gln Lys Gly Ile Val Thr Lys Pro	
360 365 370	
ATA GTC GCA AAT GAC CAT ATT CAA ACA TAT ATC GAT CAT AAT GAA CCA	1388
Ile Val Ala Asn Asp His Ile Gln Thr Tyr Ile Asp His Asn Glu Pro	
375 380 385 390	
AAT TTA TGG ACC TAT TAT TGC TGT GCC CAA AAT CAA AAA GTA AGC AAT	1436
Asn Leu Trp Thr Tyr Tyr Cys Cys Ala Gln Asn Gln Lys Val Ser Asn	
395 400 405	
CGA TTT ATG GCG ATG CCT TCA GCA AGA AAT CGA ATT ATC GCT ACA CAA	1484
Arg Phe Met Ala Met Pro Ser Ala Arg Asn Arg Ile Ile Ala Thr Gln	
410 415 420	
TTA TTC AAA TAC GAC ATC GAA GGA TTT CTT CAT TGG GGA TAT AAT TTT	1532
Leu Phe Lys Tyr Asp Ile Glu Gly Phe Leu His Trp Gly Tyr Asn Phe	
425 430 435	
TAC AAC AGT CAG TAC TCG ATA GAG CCA ATT GAT CCT TAT GTC ATA ACG	1580
Tyr Asn Ser Gln Tyr Ser Ile Glu Pro Ile Asp Pro Tyr Val Ile Thr	
440 445 450	
GAT GCA AAA AAT GCT TTT CCT TCA GGT GAT ACA TTC CTC GTC TAT CCT	1628
Asp Ala Lys Asn Ala Phe Pro Ser Gly Asp Thr Phe Leu Val Tyr Pro	
455 460 465 470	
GGG AAA GAT GGA GAA GCA ATT CCG TCC ATA CGC TCC CGA GTC TTT TAT	1676
Gly Lys Asp Gly Glu Ala Ile Pro Ser Ile Arg Ser Arg Val Phe Tyr	
475 480 485	
CAC GCT TTG CAA GAT TTG CGC GCG TTT CAA TGG CTA GAA CAA TTA AAA	1724
Ile Ala Leu Gln Asp Leu Arg Ala Phe Gln Trp Leu Glu Gln Leu Lys	
490 495 500	
GGA AAA GAT TTT GTT TTG AAT ATA ATT GAA AAA TAT CAA ACA ATC ACT	1772
Gly Lys Asp Phe Val Leu Asn Ile Ile Glu Lys Tyr Gln Thr Ile Thr	
505 510 515	
TTC TCT GAT TAT CCA AAA GAG AAG GAA TAT ATT TTC CAG ATT AGA GAA	1820
Phe Ser Asp Tyr Pro Lys Glu Lys Glu Tyr Ile Phe Gln Ile Arg Glu	
520 525 530	
GAG ATT AAT AGG GAA ATA GAA AAA GCG CTA AGT GAA TAAATTA AAA	1866
Glu Ile Asn Arg Glu Ile Glu Lys Ala Leu Ser Glu	
535 540 545	
AGGCGATGGG ATTTTATCC TTGCTTTT TTGCTTTT GCTAAGGCTC TGAACATGGA	1926
TGTTGATTC CGCTCCAGGC GCTGTTTT CGCGGGGAGT TCGGGAGCTT CCTCGCTGCG	1986
TGCTGTGGG ATCTCCGGA GACTCTTCTT CCGCAGGAG TCTTGCGCT TCCTCTACAA	2046
TCAACAGAGT AGAAAAATCA GCAATGAGCT TTAATATAG TCTTATAAAA ATAATAATTG	2106
ATATTTCTG TTTTAAATCA TCTCAATTTC AATTAATCCA TCAACTGGCT CTACCATTTT	2166



GTCTCTTTT TCTTTTCTT TTTCACGAAC GATGACAGGT TTATTGGATT TTAGAATAAA 2226  
TGAAT 2231

【0082】

【配列番号1】

配列の長さ: 19

配列の型: アミノ酸

配列:

Ala Asn Ile Asp Phe Gln Leu Ser Asp Ser Leu Glu Lys Ile Phe Pro

1

5

10

15

Asp Thr Pro

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: N末端フラグメント

【0083】

【配列番号5】

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

配列:

GCNAAATATYG AYTTCYCA

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

17

【0084】

【配列番号6】

配列の長さ: 17

配列の型: 核酸

配列:

GARAARATHT TYCCNGA

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 (合成DNA)

17

【図面の簡単な説明】

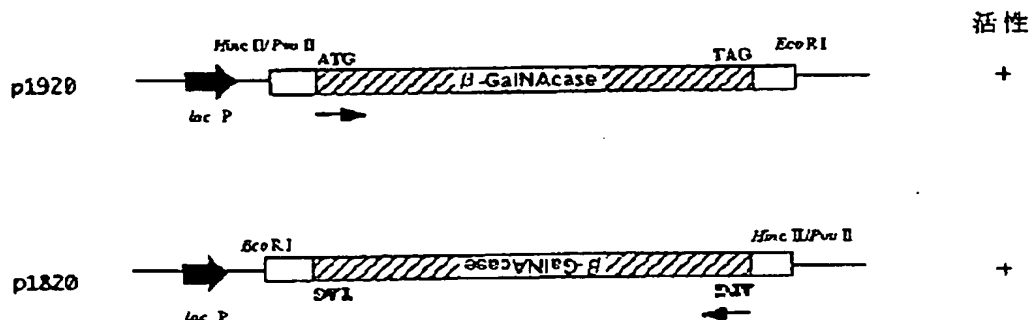
【図1】 図1は、プラスミドp1820およびp1920の構造を示す図である。

【図2】 図2は、欠失変異誘発法を用いた $\beta$ -GalNAc

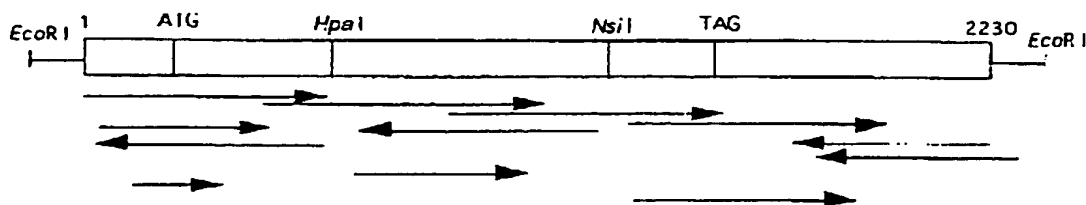
se遺伝子のヌクレオチド配列の決定の方法を示す図である。

【図3】 図3は、ヌクレオチド配列決定のストラテジーを示す図である。

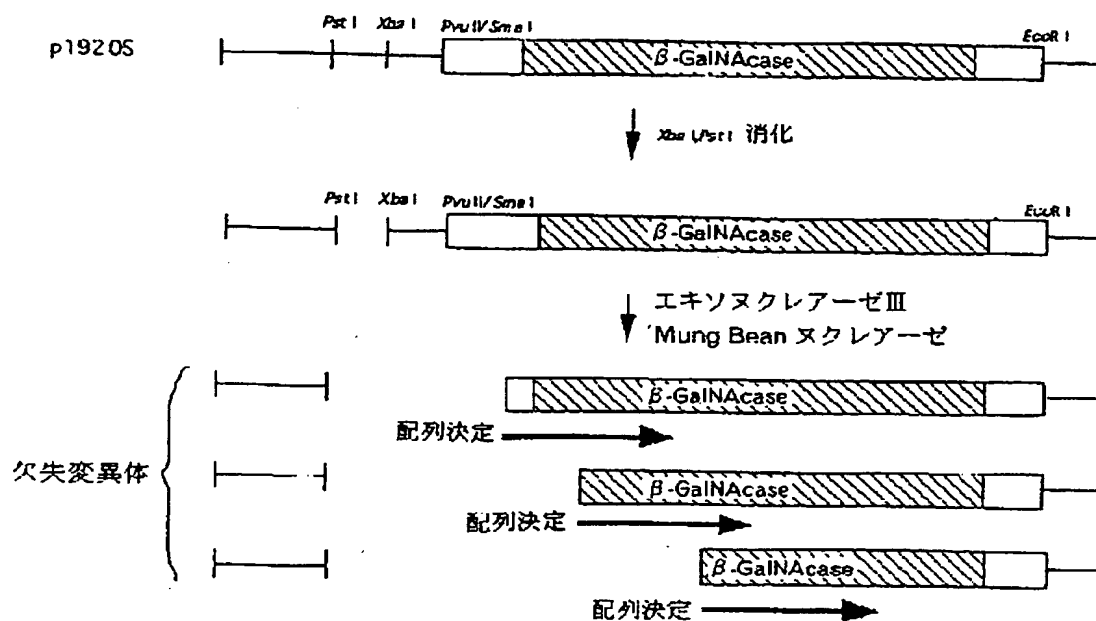
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F1

(C12N 1/21

C12R 1:19)

(C12N 9/24

C12R 1:19)

(72) 発明者 関 達治

大阪府豊中市新千里西町2-1 A24-

108

(72) 発明者 吉田 敏臣

大阪府吹田市山田西2-4 A-1-505